

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

DB

PUBLICATION NUMBER : 06172217
PUBLICATION DATE : 21-06-94

APPLICATION DATE : 21-05-91
APPLICATION NUMBER : 03116158

APPLICANT : TAITO KK;

INVENTOR : HAGIWARA KATSUTSUGU;

INT.CL. : A61K 39/39 A61K 31/715 A61K 39/02 A61K 39/12 // C08B 37/00

TITLE : IMMUNE EFFECT ENHANCER FOR VACCINE

ABSTRACT : PURPOSE: To provide an immune effect enhancer for vaccine which has very low toxicity and can be applied as a food or feed.

CONSTITUTION: The immune effect enhancer for viruses and bacteria comprises an effective amount of a glucan having β -1,3-glycoside linkages as a major chain such as schizophyllan, lentinan or scleroglucan. The dose of the glucan is orally 1 to 1,000mg/kg, preferably 10 to 200mg/kg, and 0.1 to 100mg/kg, preferably 1 to 50mg/kg in injection. When it is applied as a food or feed, it is in no need of exact purification, may be a crude product or the dried culture mixture as such for polysaccharide production.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-172217

(43)公開日 平成6年(1994)6月21日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 39/39		9284-4C		
31/715	A G Z	8314-4C		
39/02	A D Z	9284-4C		
39/12	A D Y	9284-4C		
// C 08 B 37/00	C	7329-4C		

審査請求 未請求 請求項の数7(全6頁)

(21)出願番号 特願平3-116158	(71)出願人 台糖株式会社 東京都中央区日本橋大伝馬町7番5号
(22)出願日 平成3年(1991)5月21日	(72)発明者 本間 守男 兵庫県神戸市北区鳴子2-6-10
特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年1月25日 日本細菌学会発行の「日本細菌学雑誌V o 1. 46, N o. 1, 1991」に発表	(72)発明者 堀田 博 大阪府高槻市真上町2-2-12
	(72)発明者 萩原 克嗣 兵庫県加古川市加古川町本町87
	(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外7名)

(54)【発明の名称】ワクチンの免疫効果増強剤

(57)【要約】

【構成】 β -1, 3-グリコシド結合を主鎖とするグルカンを含有するウイルスならびに細菌用ワクチンの免疫効果増強剤。

【効果】天然物由来のものであるため低毒性。食品又は飼料として施与可能。必ずしも精製したものである必要はない。

が、経口投与により免疫賦活作用を示すこと (International Journal of Immunopharmacology, Vol 12, No. 6, 675-684, 1990) ならびに当該多糖の一種であるレンチナンが経口投与により血液中のリンパ球サブセット (Subset) を変動させること (消化器と免疫, No. 20, 78~82頁, 1988) 等から、当該多糖を経口投与した時のワクチンとの併用効果について鋭意研究を行った。

【0011】その結果、それらの単独投与に比べ、ワクチンと当該多糖とを併合投与すると、血中及びIgA抗体産生は共に増強され、また細胞性免疫の指標の一つであるマクロファージの活性も高められることが認められたのである。更にまた、ワクチン使用量を大幅に減らしても有効な感染防御効果の得られることが確認され、前述のすべての課題を解決する事ができたのである。

【0012】本発明でいう当該多糖とは、通常は β -1, 3-グリコシド結合を主鎖とし、 β -1, 6-グリコシド結合を側鎖に有する分岐 β -1, 3-グルカンをいう。たゞし β -1, 6結合のない直鎖 β -1, 3-グルカンであつてもよい。この種の分岐及び直鎖 β -1, 3-グルカンは広く真菌類全般に分布している。特に普通キノコと呼ばれる担子菌類の子実体に多く含まれている。また担子菌類の培養液中からも高収量で得られる。

【0013】前述したシゾフィランあるいはレンチナン等は、キノコ由来の多糖としてよく知られている。また、スクレロチウム属の生産するスクレログルカン、アルカリゲネス属の生産するカードラン等もよく知られている。さらに、これら β -1, 3-グルカンのあるものは、化学的に修飾すると免疫賦活活性が上昇する。従って本発明に於ては β -1, 3-グルカンを化学的に修飾した誘導体も、当該多糖に含まれるものとする。加うるに、真菌類がその細胞壁構成多糖として、 β -1, 3-グルカンを含むこともよく知られており、(日本醸造協会雑誌、第82巻、第9号、598~685頁、1987)、真菌類に属する酵母の細胞壁 β -1, 3-グルカンがマウスの免疫能を増強することも報告されている (Trends in pharmacological Sciences 4, 344-347, 1983)。それ故、これら真菌類の細胞壁破碎物も当然、本発明の当該多糖に包含されるものとする。

【0014】本発明者等は、このようにシゾフィランの生産菌でキノコの一種であるスエヒロタケの菌体破碎物に、ワクチン増強効果を認めることができ、また真菌類の菌体自体にもウイルス感染防御効果が存在するということを確認したのである。なお中性多糖の腸内吸収は難しいというのが通説となっており (食品加工技術Vol. 25, No. 4, P. 271, 1988) (化学と生物 Vol. 25, No. 4, P. 273, 1987)、実際当該多糖を経口投与した場合、体内リンパ球サブセットの変動、或は多少の腫瘍増殖抑制効果等の免疫能の賦活を示唆する傾向は見られるものの、臨床的に癌治療ができるというような治療効果については、今のところ報告されていない。

【0015】通常、当該多糖の免疫賦活作用を有効に働かせる為には注射による体内投与が望ましいと考えられる。その場合には呼吸気道や消化管粘膜上で分泌されるIgA抗体の産生亢進はみられず、そのためIgA抗体が感染防御に重要な働きを演じるインフルエンザワクチンの免疫能増強にはやや難点がある。一方当該多糖を経口投与した場合には、当該多糖が呼吸気道及び消化管粘膜と適度に接触し、それらの粘膜を刺激することによってIgA抗体の分泌を促し、血中抗体、細胞性免疫及びIgA抗体の3つの機構によって生体をウイルス感染から防御するようになることが認められた。例えばインフルエンザワクチンに対しても有効な免疫増強効果を示すことが予想され、事実、本発明者等は当該多糖の経口投与により、インフルエンザウイルスと近縁な関係になるセンダイウイルスのワクチン投与に伴うIgA抗体の有意な産生増強と感染防御効果の増強を確認するに至ったものである。

【0016】理論に拘泥する意図はないが、本発明に於て、当該多糖によるワクチン免疫効果の増強作用は、当該多糖により宿主防御機構が非特異的に活性化される為と考えられる。ちなみに、当該多糖はどのような種類のワクチンでもその免疫効果を亢進させ得、それ故、ウイルスワクチンの種類を問わず、細菌ワクチンにも巾広く適用可能であることが判明した。更にまた、原虫疾患、例えばマラリア等にも有効性が期待できる。

【0017】当該多糖の体内への投与方法は注射、経口のいずれであってもよい。ワクチンの種類、宿主の状態等に合わせ適宜選択すればよい。しかしながらIgA抗体産生の賦与、投与の際の安全性、容易さ等の観点から注射による投与より経口投与の方が望ましい。また、当該多糖とワクチンとをあらかじめ混合して経口投与してもよい。

【0018】更に、経口投与では当該多糖を高度に精製する必要もなく、例えば当該多糖生産菌の菌体あるいは、それらの混合物をそのまま利用できる等の利点を有し、それにより製造コストの軽減も可能となったのである。本発明に於て当該多糖の投与量は、経口投与の場合 1 mg/kg ~ 1 0 0 0 mg/kg、また注射投与の場合は 0. 1 mg/kg ~ 1 0 0 mg/kg で有効であるが、望ましくは経口投与の場合は 1 0 mg/kg ~ 2 0 0 mg/kg、注射投与の場合 1 mg/kg ~ 5 0 mg/kg である。

【0019】

【本発明の効果】本発明の当該多糖は体内的消化酵素による分解を受けにくく、非常に低毒性であって、注射による投与でもほとんど副作用を示さない。従って経口投与では毒性は皆無であるという大きな特徴を有する。加えて本発明の当該多糖は天然物であり、低毒性であるので、食品あるいは動物の飼料として服用しても、そのワクチン増強効果は十分に期待できる。なお、当該多糖を食品や飼料として利用する場合には、あまり精製する必

S P G投与量 (mg/kg)	H I U (腹腔内投与)						H I U (経口投与)					
	0	5	7	14	21		0	5	7	14	21	
	(感染後、日)						(感染後、日)					
0(コントロール)	<16	<16	<16	16	16		<16	<16	<16	<16	<16	
1	<16	<16	<16	16	16		N D					
5	<16	<16	16	32	32		N D					
10	<16	<16	64	64	128		<16	<16	16	16	16	
50	<16	<16	32	64	64		<16	<16	16	32	32	
100	<16	<16	16	16	32		<16	<16	32	64	128	
200		N D					<16	<16	32	64	64	
500		N D					<16	<16	16	64	64	

ND : 測定しなかった。

【0027】S P Gをワクチンと併用することによりワクチン単独の場合よりも血中抗体価の上昇が認められた。S P Gを腹腔内投与した場合にはS P G投与量が10 mg/Kg、S P Gを経口投与した場合にはS P G投与量が100 mg/Kgで、それぞれ最大の血中抗体価が得られた。

実施例3

実施例1と同様の方法でS P G、菌体及びS P G含有菌体並びにワクチンの接種(500 C I U)を行った。ワクチン接種後14日目にマウス腹腔からマクロファージ*

*を採取し、マクロファージの個数を顕微鏡で計数した。また、マクロファージの活性を以下の通りに行った。線維肉腫S M T - 5(標的細胞)と採取したマクロファージ(エフェクター細胞)を1:7の割合で混合し、CO₂培養器にて24時間培養した。培養終了8時間前に³H-チミジンを添加し、残存する標的細胞中に取り込まれた³H-チミジン量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【0028】マクロファージの活性は以下の式で求めた。

$$\text{マクロファージ活性(%)} = \frac{(\text{対照群の}^3\text{H-チミジン量}) - (\text{マクロファージ添加群の}^3\text{H-チミジン量})}{(\text{対照群の}^3\text{H-チミジン量})} \times 100$$

なお、対照群の³H-チミジン量とは、マクロファージ※ジン量をさす。
を加えない場合の標的細胞中に取り込まれた³H-チミジン量【0029】表3に示す結果を得た。

表3. マクロファージ活性化に対するワクチンとS P G及び菌体の影響

試 料	投与経路	マクロファージ /body ($\times 10^6$)	マクロファージ 活性 (%)
ワクチン 500 CIU	腹腔内投与	4.52	10.5
ワクチン 500 CIU+S P G	腹腔内投与	9.33	21.7
ワクチン 500 CIU+S P G	経口投与	6.81	19.8
ワクチン 500 CIU+S P G含有菌体	経口投与	7.81	22.2
ワクチン 500 CIU+ 菌体	経口投与	6.37	20.3

ワクチン単独に比べ、ワクチンとS P Gあるいは菌体を併用することによりマクロファージの産生増強及び活性化が認められた。

実施例4

実施例1と同様の方法でS P G、菌体及びS P G含有菌体の投与、並びにワクチン接種を行った。ワクチン接種14日後にマウスを殺し、気管及び気管支をP B S(リン酸緩衝生理食塩水 Phosphate Bufferd Saline)1mlで2回洗浄し、P B S中に回収されたIgAをEnzyme Link 50【0030】

ed Immunosorbent Assay (E L I S A法)により測定した。結果を表4にまとめて示した。

E L I S A法: プレートにセンドライウイルスを固定し、これに被検液を反応させた。次に、バーオキシダーゼ標識抗マウスIgA免疫グロブリンを反応させた後、フェニレンジアミン2HClを加え発色させた。O D₄₅₀を測定、標準IgAより得た検量線より、被検液中のIgA量を求めた。